

But

- Décrire la procédure mise en place pour effectuer le contrôle du statut axénique à l'animalerie du CRCHU de Québec-Université Laval.

Généralités

- Le personnel de l'animalerie doit aviser l'assistant-chef si cette procédure ne peut être respectée.
- Les techniciens et techniciennes de l'animalerie qui travailleront avec les souris axéniques doivent préalablement suivre une formation pratique donnée par un technicien qualifié.
- Le concept de base pour le maintien d'une colonie de type axénique est la prévention de la contamination. Cette prévention se fait notamment par la stérilisation de tout le matériel à l'aide de la vapeur d'eau (autoclave), irradiation, stérilisation de surface ou la stérilisation au gaz.

Définitions

- **Axénique** : Se dit d'un élevage ou d'un animal exempt de bactéries, virus, fungus ou parasites (à l'exception des virus endogènes). Ces animaux doivent être hébergés en conditions stériles.

Matériel

- Isolateur semi-rigide de type Park BioServices
- Écouvillons stériles
- Tubes stériles à prélèvement
- Paniers d'hébergement de souris vides ou tout autre contenant similaire
- Nourriture stérile destinée aux souris
- Eau stérile destinée aux souris
- Géloses
- Cloche d'incubation
- GasPak
- Incubateur
- Brûleur

Formulaire(s) ou PNF relié(s) à cette procédure

- FORM-CHU #005 Registre des activités quotidiennes
- ANI-08 Hébergement des souris axéniques
- FON-10 Méthode de travail en isolateur semi-rigide à statut axénique
- FON-11 Mise en service d'un isolateur axénique
- FON-12 Stérilisation du matériel destiné aux colonies axéniques
- HEB-07 : Hébergement des souris axéniques

Responsabilités

- Toute personne (TSA) travaillant avec les isolateurs permettant l'hébergement de souris axéniques doit respecter cette PNF et communiquer avec l'assistant-chef de dérivation pour toute question.

Procédure

I. Généralités

- 1- Le contrôle du statut axénique se fera de trois façons.
 - A) Par des prélèvements de spécimens au niveau de la cage de l'animal.
 - B) Par des frottis directs de l'intérieur de l'isolateur.
 - C) Par une mise en culture passive dans l'intérieur de l'isolateur (nourriture humidifiée).
- 2- Tous les prélèvements doivent se dérouler à l'intérieur de l'isolateur, en milieu axénique, afin d'éviter la contamination des échantillons entraînant un faux positif.
- 3- Une attention particulière est portée afin d'éviter tout contact entre l'échantillon prélevé et un désinfectant en circulation dans l'isolateur afin d'éviter un faux négatif.
- 4- Les échantillons prélevés seront acheminés aux laboratoires de microbiologie (Charles River et/ou l'animalerie) pour mise en culture (aérobie et anaérobie) et recherche de micro-organismes opportunistes (bactéries et champignons).
- 5- Un contrôle du statut axénique doit être fait avant l'entrée d'animaux axéniques, au moment de l'entrée d'animaux et sur une base régulière en période d'utilisation de l'isolateur.

II. Contrôle initial avant l'arrivée des animaux.

- 1- Avant l'arrivée des animaux, l'isolateur doit cumuler trois semaines consécutives de résultats négatifs.

- 2- Suite à la mise en fonction de l'isolateur, une fois les parois de l'isolateur bien sèches et exemptes de désinfectant, on procède à l'entrée d'un premier chargement de matériel qui comprend au moins un sac de nourriture, un sac de litière, une bouteille d'eau et le matériel d'échantillonnage soit : tubes et bouchons (un par semaine) et plusieurs écouvillons.
- 3- Les cages d'hébergement des animaux sont préparées afin qu'elles subissent les trois tests précédant l'arrivage.
- 4- Une culture passive est effectuée. Voir section IV pour les détails sur cette technique. Les échantillons de cette mise en culture seront analysés les semaines 2 et 3.
- 5- Un frottis direct est effectué sur l'ensemble des surfaces intérieures de l'isolateur. Voir section IV. Ces frottis sont effectués et analysés lors des semaines 1, 2 et 3.
- 6- Il est à noter qu'à défaut d'eau souillée, comme l'isolateur n'est pas encore habité, l'eau utilisée pour les frottis et la culture passive sera une eau stérile.

III. Contrôle de routine sur les isolateurs habités.

- 1- Effectuer un contrôle de stérilité de chaque isolateur habité à chaque semaine.
- 2- Ce contrôle comprend :
 - A) Une récolte de spécimens. Voir section IV point 1
 - B) Un frottis direct. Voir section IV point 2
 - C) Une culture passive. Voir section IV point 3

IV. Prélèvements de spécimens au niveau de la cage de l'animal, frottis direct et culture passive.

- 1- Récolte de spécimens :
 - A) Prélever des fèces, poils et morceaux de litière aléatoirement au niveau des paniers hébergeant les souris et mettre dans un tube stérile.
 - B) Ajouter quelques gouttes d'eau souillée venant des bouteilles d'eau des souris pour un volume total d'environ 1-2 ml.
- 2- Frottis direct :
 - A) Humidifier un écouvillon avec l'eau souillée provenant d'une bouteille en utilisation, lorsque disponible, et passer au niveau de la litière souillée, de la nourriture et des parois intérieures de quelques cages et grillages en utilisation, sur les parois intérieures de l'isolateur (plafond, murs, façade souple, manchons, gants, tablettes et porte intérieure), les sacs de nourriture, litière et autres consommables. Ne pas oublier les ouvertures vers les filtres HEPA d'entrée et de sortie d'air (à l'intérieur de l'isolateur).
 - B) Porter une attention particulière afin de diriger les frottis vers les zones à

risques comme les bouts de doigts, entre les doigts, les coins et jonctions de la façade souple.

- C) Mettre l'écouvillon dans le tube stérile contenant les fèces et l'eau de boisson des souris.
- D) Laisser le tube à température ambiante jusqu'à la mise en culture.
- E) Suite à la mise en culture, garder le tube original d'échantillonnage à température ambiante pour une semaine en attendant les résultats. Utiliser ce tube pour la confirmation d'un positif le cas échéant.

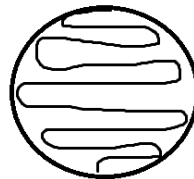
3- Mise en culture passive :

- A) Prendre un contenant bas possédant une ouverture très large, comme par exemple un panier d'hébergement de souris mis de travers dans un autre panier afin de former une cuvette.
- B) Déposer une portion d'environ une à deux tasses de nourriture stérile pour souris dans le contenant.
- C) Ajouter ensuite assez d'eau souillée (eau d'abreuvement des souris) lorsque disponible, pour couvrir la nourriture et permettre une humidification complète des croquettes.
- D) Insérer 2-4 écouvillons, répartis également dans la pâte obtenue.
- E) Ramasser les écouvillons aux semaines 1, 2 et 3 s'il s'agit d'un « Contrôle initial avant l'arrivée des animaux ».
- F) Ramasser un écouvillon par semaine s'il s'agit d'un « Contrôle de routine sur les isolateurs habités ».
- G) Mettre l'écouvillon dans le même tube que les frottis directs.

V. Mise en culture :

1- Sur gélose :

- A) Pour l'échantillon contrôle, prendre un écouvillon stérile et le passer délicatement sur une surface non stérile pour avoir le plus de bactéries possibles.
- B) Ensemencer les différentes géloses par la technique d'ensemencement complet avec les échantillons fournis.



- C) Les échantillons doivent idéalement être mis en culture dans les 24 heures suivant la récolte.
- D) Mettre la gélose contrôle et une des deux autres géloses en culture aérobie à 37°C pendant 24h. Prendre soin de déposer les géloses couvercle vers le bas pour éviter que de la condensation se forme et que des gouttes d'eau tombent sur la gélose.

- E) Pour la culture anaérobie, prendre un sac hermétique de type Ziploc. Prendre ensuite un GasPak, l'ouvrir et le mettre dans le sac avec le(s) pétri(s). Mettre un indicateur à oxygène et fermer le sac hermétiquement, le mettre à 37°C pendant 72h.
- F) Si un transport ou un délai plus grand avant la mise en culture est nécessaire, le tout doit, si possible, être validé par l'envoi d'échantillons positifs afin d'évaluer le suivi de l'échantillon et sa capacité à coloniser un milieu.
- G) La mise en culture et l'analyse des résultats se feront dans les locaux de l'animalerie pour les tests hebdomadaires.
- H) Mensuellement, un contrôle sera envoyé à un laboratoire externe effectuant des analyses microbiologiques (ex : Charles River).

2- Coloration

- A) Réaliser un frottis sur une lame de microscope avec les échantillons prélevés. Si les échantillons ne sont pas assez liquide, déposer une goutte d'eau stérile. Étaler l'échantillon et fixer à la flamme d'un brûleur.
- B) Mettre du cristal violet sur la lame pour couvrir l'échantillon au complet. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute, puis rincer à l'eau déminéralisée.
- C) Étaler le mordant (Lugol) sur la lame pour couvrir l'échantillon au complet. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute, puis rincer à l'eau déminéralisée.
- D) La décoloration : l'étape la plus importante de la coloration. Prendre le mélange d'alcool/acétone d'une main et de l'autre prendre la lame et la mettre en position oblique de façon à ce que l'alcool s'écoule facilement. Verser goutte à goutte le mélange d'alcool/acétone et surveillez la décoloration qui doit être rapide. Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincez abondamment pour arrêter la décoloration.
- E) Mettre de la safranine sur la lame de façon à couvrir l'échantillon au complet. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée et laisser sécher la lame.
- F) Observer avec une goutte d'huile à immersion objectif 100x (grossissement 1000)
- G) La coloration est effectuée une fois semaine sur les mêmes échantillons que la mise en culture et est analysée par les techniciens de l'animalerie. Cette coloration donne une première évaluation du statut bactérien des colonies en attendant les résultats de la mise en culture.

Références

- Park BioServices, « Online Training Site and Germfree Workshops ».
- Taconic Biosciences "Flexible Film Isolator Demo"
- Taconic Biosciences

	<u>Modifications apportées</u>
Version 2 5 janvier 2024	• Modification des PNF d'hébergement